福建产尖吻蝮蛇(*Agkistrodon acutus*)蛇毒的柱层析分离及酶活力和某些生理效应的测定

刘广芬 邱淑玉 李 斌 涂光俦

(福建医大药理教研组) (中国科学院昆明动物研究所)

摘 要

用二乙氨基乙基葡聚糖凝胶A—50 (DEAE-Sephadex A—50)对福建产尖吻蝮蛇蛇毒进行柱层析分离，获得11个蛋白峰。其中第一峰具有蛋白水解酶及磷酸二酯酶活力，同时还有纤维蛋白溶解作用及局部出血作用。第Ⅵ峰具有较强的精氨酸酯酶活力及凝血酶样的直接凝血效应。第Ⅰ及Ⅳ峰能明显延长血液凝固时间，呈抗凝血效应。第Ⅹ峰具有明显的毒性作用，腹腔注射于小白鼠，可致远隔部位的皮下、肌肉、胸壁内侧以及腹腔等处出血甚至死亡。

尖吻蝮蛇粗毒具有较高的蛋白水解酶、精氨酸酯酶、5′—核苷酸酶及磷酸二酯酶的活力，而碱性磷酸单酯酶、L—氨基酸氧化酶及磷酯酶A的活力均较低，胆碱酯酶的活力近于零。

尖吻蝮蛇主要分布于我国南方各省，如浙江、福建、江西、安徽、湖南、广东、广西、湖北及台湾省等地[1]。关于尖吻蝮蛇粗毒的毒理学已进行了动物急性毒性测定，局部毛细血管通透性试验及全身血液凝固系统、心血管系统的毒性作用试验[2、3]。台湾省药理学工作者从台湾省产的尖吻蝮蛇毒中分离并纯化出凝血酶样酶、纤维蛋白溶解成分及抗凝血成分，并对这些纯化的成分进行了理化特性分析及毒理试验[7—12]。

鉴于尖吻蝮蛇在福建闽北各县分布较广，蛇伤较多见，死亡率可达10%左右。对尖吻蝮蛇毒作进一步理化特性及毒理学分析很有必要，同时亦为蛇毒的利用打下理论基础。

本文于1979年10月4日收到。

材料与方法

一、蛇毒：尖吻蝮蛇系福建省光泽县产，饲养于福建医科大学蛇园内，定期采集毒液，经真空低温干燥后，得白色无定形固体。

二、试剂和实验动物：

二乙氨基乙基葡聚糖凝胶A—50（DEAE-Sephadex A—50）为Pharmacia进口，交换当量3.5±0.5毫克当量克。酶的底物同前文[4,5]。其他化学试剂为国产分析纯试剂。动物：家兔1.5～2.5公斤，小白鼠18～24克，雌雄并用。

三、酶活力和生理效应的测定：

酶活力测定方法同前文[4,5]。

血液凝固性测定：0.1毫升家兔柠檬酸盐血浆与0.1毫升样品在37°C水浴中保温5分钟，加0.1毫升$2.5\times10^{-2}M$ $CaCl_2$溶液，观察血浆凝固时间（复钙时间）并记录之；对照管是以含0.15M NaCl的Tris-HCl缓冲液（pH7.3）代替样品。

无钙血液凝固性测定：0.1毫升家兔柠檬酸盐血浆事先在37°C水浴保温5分钟，加样品0.1毫升，观察血浆凝固时间并记录之；如发生凝固，说明样品具有凝血酶样酶作用。

纤维蛋白溶解作用测定：取家兔柠檬酸盐血浆0.1毫升，加$2.5\times10^{-2}M CaCl_2$液溶0.1毫升，待纤维蛋白凝块形成后，加0.2毫升样品于凝块上，置37°C保温24小时，观察凝块有无溶解。

局部出血测定：家兔于实验前一天用硫化钡淀粉糊将腹壁毛脱净。选4点，每点皮内注射样品0.2毫升，每只腹壁均同时用含0.1%粗毒生理盐水0.2毫升及生理盐水0.2毫升分别皮内注射一点，以作对照。注射后2、4及6小时观察局部有无肿胀及出血。

毒性测定：小白鼠禁食12小时（但不禁水）每组10只，各组分用量均按100微克/10克体重计算，腹腔注射，观察48小时各组的死亡情况。（注：粗毒1毫克/1毫升的A_{280nm}≎1.4）

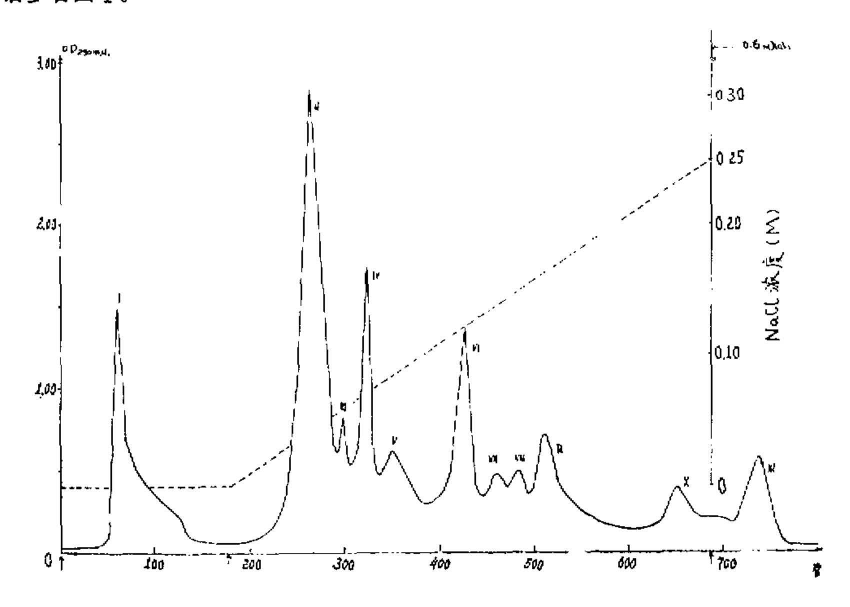
结　　果

一、柱层析分离：

本文采用的柱层析分离的条件是：DEAE-Sephadex A—50，经碱—酸—碱处理后，用0.01M三羟甲基氨基甲烷—盐酸（Tris—HCl）缓冲液（pH8.6）浸泡并平衡装柱，柱高53厘米，容积230毫升。尖吻蝮蛇毒800毫克溶于上述缓冲液10毫升中上柱。分三步洗脱，第一步用平衡缓冲液洗脱。第二步加NaCl直线梯度洗脱，搅拌瓶盛1200毫升缓冲液，贮存瓶盛1200毫升含有0.3M NaCl的缓冲液。第三步用含有0.6M NaCl的缓冲液300毫升洗脱。洗脱液用部分收集器收集，每15分钟收集一管，每管3.8毫升，每管蛋白质的含量在国产751型分光光度计上测定280nm的光吸收（A_{280nm}）。

粗毒经上述柱层析后分得11个蛋白峰，蛋白回收率以A_{280nm}计算达104.6%，分离

图谱参看图Ⅰ。



图Ⅰ福建产尖吻蝮蛇毒柱层析图

二、粗毒的酶活力及其在各蛋白峰的分布：

粗毒的蛋白水解酶、精氨酸酯酶、磷酸二酯酶及5′—核苷酸酶的活力较高，L—氨基酸氧化酶、磷酯酶A、碱性磷酸单酯酶的活力较低，胆碱酯酶的活力近于零。蛋白水解酶及磷酸二酯酶分布在第Ⅰ峰。精氨酸酯酶分布在第Ⅵ峰。5′—核苷酸酶主要分布在Ⅶ及Ⅷ峰，参看表Ⅰ及Ⅱ。

表Ⅰ．尖吻蝮蛇粗毒的酶活力

酶的名称	活力
蛋白水解酶	21微克酪氨酸/毫克、分
精氨酸酯酶	457微克分子/毫克、分
磷酸二酯酶	1.9×10⁻¹微克分子/毫克、分
5′—核苷酸酶	1.67微克分子Pi/毫克、分
碱性磷酸单酯酶	1×10^{-3}u/A_{260}
磷酯酶A	半数溶血量：22.9(20～24.5)毫克蛇毒/毫升
L—氨基酸氧化酶	0.84×10^{-3}微克分子/毫克、分

表Ⅱ 尖吻蝮蛇毒柱层析各蛋白峰的酶活力及生理效应分布

峰号	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ	Ⅵ	Ⅶ	Ⅷ	Ⅸ	Ⅹ	Ⅺ
在粗毒（原毒）中的含量%	4.4	22.8	2.5	7.9	5.1	7.1	2.3	2.2	7.0	3.1	4.2
蛋白浓度 (A_{280nm}/Ml)	0.95	1.31	0.69	1.02	0.47	0.86	0.465	0.455	0.51	0.28	0.38
蛋白水解酶	+++										
精氨酸酯酶						+++	+				
磷酸二酯酶	+++		+	+							
5'—核苷酸酶					+	++	+++	+++	++		
碱性磷酸单酯酶						+	+				
磷酯酶A											+
L—氨基酸氧化酶			+								
凝血酶样作用						+++	++				
抗凝血作用	+++							+++	+		
纤维蛋白溶解作用	+++										
局部出血	+++										
毒性									+	+++	

注：尖吻蝮蛇粗毒1.0毫克/毫升的A_{280nm}≎1.4

三、粗毒的某些生理效应及其在各蛋白峰的分布：

1．纤维蛋白溶解作用：0.1%粗毒溶液0.2毫升（含毒200微克）与纤维蛋白凝块保温12小时左右，可使其全部溶解成乳白色混浊液。第Ⅰ组分0.2毫升（蛋白质含量≎136微克）具有同样的效应，其他各组分均无纤维蛋白溶解作用。

2．无钙凝血作用：0.1%粗毒溶液0.1毫升在试管内能使家兔柠檬酸盐血浆于无钙条件下发生凝固，并使此纤维蛋白凝块于37°C保温12小时左右，溶解成乳白色混浊液。由此说明粗毒在试管内，首先由于其含有凝血酶样酶使血液凝固，继之，由于粗毒中尚含有纤维蛋白溶解成分，因此迅速使纤维蛋白凝块溶解。各组分中仅Ⅵ及Ⅶ组分能使柠檬酸盐血浆于无钙条件下凝固；但与粗毒不同，继续保温不会使纤维蛋白溶解。其余各组分均无上述效应，说明第Ⅵ及Ⅶ组分具有凝血酶样酶效应。

3．抗凝血效应：粗毒在试管内不影响血浆复钙时间。第Ⅰ及Ⅸ组分在试管内明显

延长柠檬酸盐血浆复钙时间（自正常的90～120秒延长至30分以上），说明具有抗凝血效应。其他各组分无明显影响。

4. 局部作用：0.1%粗毒溶液0.2毫升皮内注射于家兔腹壁、注毒后2小时，局部出现明显肿胀及出血斑。各组分0.2毫升分别皮内注射，仅第Ⅰ组分出现局部肿胀及出血斑，局部出血效应随剂量增大而加强。其余各组分虽剂量增大到1.0毫升，亦不发生局部作用，参看图2。

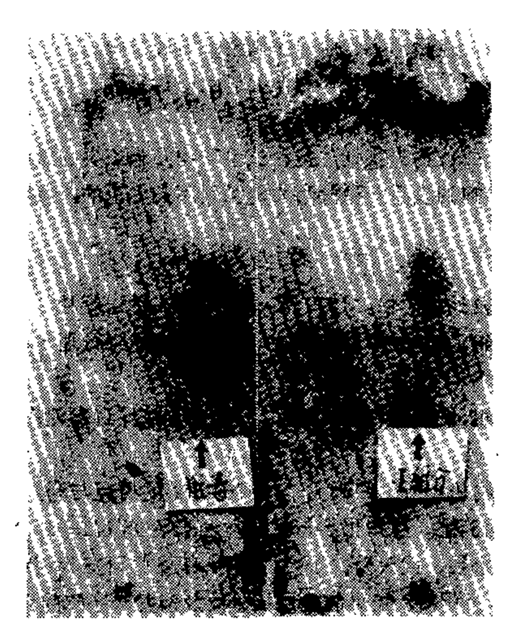


图2　尖吻蝮粗毒及第Ⅰ组分对家兔皮肤的局部作用

5. 毒性测定：尖吻蝮粗毒对小白鼠腹腔一次注射的半数致死量(LD_{50})为4.4(3.67～5.28)毫克/千克体重(2)。蛇毒经层析后，分别探讨各组分的毒性，结果其致死毒性主要分布在第Ⅹ组分。第Ⅸ组分呈轻微毒性反应。剖检中毒致死之小白鼠，胸壁、腹腔、肺脏、肌肉及皮下有出血或出血斑，其出血作用不限于注射部位（腹腔）。

讨　　论

本文用DEAE-Sephadex A—50柱层析分离尖吻蝮蛇毒，得11个蛋白峰，并测定了粗毒及蛋白峰的8种酶活力及5种生理效应。各峰的生化生理特性较为集中，这有利于今后对各组分的纯化。Ougang C等[6]曾报导台湾省产的尖吻蝮蛇毒的柱层析分离，得12个蛋白峰，并测定了第9峰具有纤溶作用，第10峰具有精氨酸酯酶及凝血酶样酶作用。

我们分离的第Ⅰ蛋白峰具有蛋白水解酶、磷酸二酯酶的活力，同时还有纤维蛋白溶解及局部出血作用。其出血与纤维蛋白溶解作用两者是否一个成分两种效应，还是两种成分所致，须待进一步纯化以后才能确定。

关于尖吻蝮蛇毒对机体的致死毒性作用，究属于那一种组分引起，过去未见报导。根据我们分析的结果，得知具有纤维蛋白溶解作用，凝血酶样作用及抗凝血作用的三个组分（Ⅰ、Ⅵ及Ⅸ组分）虽分别用量达100微克/10克体重，对小白鼠并无明显毒性作用。而第Ⅹ组分不具上述三种作用，却对小白鼠呈明显毒性作用，中毒症态不限于注射局部，呈全身广泛性出血，包括皮下、肌肉、胸壁、腹腔及肺脏。由此推测第Ⅹ组分含有出血毒成分，与第Ⅰ组分的出血作用不同，要弄清中毒机理，有待对该组分的纯化并作进一步试验，才能确定。

尖吻蝮蛇毒的磷酯酶A活力很低，但在试验动物及临床尖吻蝮蛇伤病例中均发生明显的溶血效应。推测溶血的发生与磷酯酶A的关系不是主要的，其机理尚待探讨。

参 考 文 献

1. 中国的毒蛇及蛇伤防治，1974.55—56上海人民出版社

2. 药理学教研组，蛇药蛇毒研究组，1976.五步蛇毒毒理作用观察Ⅰ. 福建医大 2：27—35.

3. 药理学教研组，蛇药蛇毒研究组，1976.五步蛇蛇毒毒理作用观察Ⅱ.福建医大 2：36—39.

4. 云南昆明动物研究所第四研究室，1976.蛇毒的研究与利用Ⅰ.我国几种常见毒蛇的蛇毒酶活力的测定。生物化学与生物物理学报 8，151—156.

5. 涂光俦、冉永禄、武天爱、于力，1979.蛇毒的研究与利用Ⅳ. 浙江产腹蛇(Agkistrodon halys pallas) 蛇毒的柱层析分离及磷酸二脂酶的大规模纯化。生物化学与生物物理学报11（2），169—174.

6. Cheng H. C. et al, 1967. Isolation of coagulant and anticoagulant principles from the venom of *Agkistrodon acutus*, *Toxicon*, 4, 235—243.

7. Ouyang C, et al, 1972. Purification and properties of the anticoagulant principle of *Agkistrodon acutus* venom, *Biochim. et Biophys. Acta* 278, 155—162.

8. Ouyang C, et al, 1973. The effect of the purified anticoagulant principle of *Agkistrodon acutus* venom on blood coagulation. *Toxicon* 11, 287—292.

9. Ouyang, C, et al., 1974. Inhibition of the thrombine-like principle of *Agkistrodon acutus* venom by group specific enzyme inhibitors. *Toxicon*, 12, 449—453.

10. Ouyang C, et al, 1976. Purification and characterization of the fibrinolytic principle of Agkistrodon acutus venom. *Biochim. et Biophys. Acta*, 439, 146.

11. Ouyang C, et al, 1977. The properties of the purified fibrinolytic

principle from *Agkistrodon acutus* snake venom. *Toxicon*, 15, 161—167.

12 Ouyang C, et al., 1978. In vivo effects of the purified thrombin-like and anticoagulant principles of *Agkistrodon acutus* (hundred pace snake) venom. *Toxicon*, 16, 583—593.

IDENTIFICATION OF PHYSIOLOGICAL EFFECTS AND ENZYMATIC ACTIVITIES IN THE VENOM OF *Agkistrodon acutus* (FROM FUKIEN) AFTER FRACTIONATION BY CHROMATOGRAPHY

Liu Kwang-fen Chiou Shu-yu Lee Bing

Department of Pharmacology, Fukien Medical University

Tu Guang-chou

Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica

ABSTRACT

The venem of *Agkistrodon acutus* (from Fukien) was fractionated on DEAE-Sephadex A—50 into 11 different protein peaks (fractions). The experimental conditions are described. In the crude venom, the specific activities of proteinase, arginine esterase, phosphodiesterase, as well as 5′-nucleotidase are higher than that of phosphomonoesterase, phospholipase A and L-amino acid oxidase. The arginineesterase and thrombin-like activities are concentrated in fraction VI. The proteinase, fibrinolytic and anticoagulant activities are concentrated in fraction I. Fraction IX also shows anticoagulant activity. The lethal action is located in fraction X.

The LD_{50} after intraperitoneal injectoin of crude venom of *Agkistrodon acutus* was found to be 4.4 mg/kg for mice.